

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-502725

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成7年(1995)3月23日

(51) Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 49/00		9051-4C	
A 6 1 B 5/055			
C 0 7 F 5/00	D	7457-4H	
		8105-2J	G 0 1 N 24/ 02
		7507-4C	A 6 1 B 5/ 05
			B
			3 8 3
			審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-503884
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)8月7日
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)2月9日
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 2 / 0 6 6 6 0
 (87) 国際公開番号 W O 9 3 / 0 3 3 5 1
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)2月18日
 (31) 優先権主張番号 7 4 3, 1 4 3
 (32) 優先日 1991年8月9日
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (31) 優先権主張番号 7 4 4, 4 7 0
 (32) 優先日 1991年8月12日
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94612
 -3550 オークランド、セカンド フロ
 ア、レイクサイド ドライブ 300
 (72) 発明者 ホワイト、デイビッド エル.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94611,
 オークランド、ブロードウェイ テラス
 9082
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 M R I 用のアミノ酸、エステルおよび/またはカテコール造影剤

(57) 【要約】

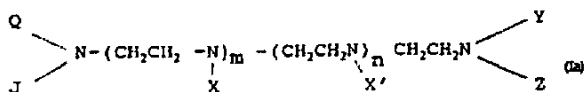
本発明は、複数のカルボン酸官能基も有する化合物を含有するアミノ酸の調製に関する。常磁性金属 (II) または (III) イオンのキレート錯体が、これらの化合物を使用して、静脈造影剤として使用するために生成され、心臓、肝臓、胆管樹、または上部小腸の高コントラストの磁気共鳴画像を生じる。EDTA、DTPA等のモノおよびジ-アミノ酸 (および、それらのカルボキシルエステル、カルボキシルアミド、およびカテコール) が調製される。常磁性金属 (II) または (III) イオンの錯体が形成され、そして、その錯体はMR画像にT1関連コントラスト効果を生じさせる。また、これら化合物および錯体は、毒性が低く、そして比較的急速に、且つ完全に、例えばヒトのような、生きている哺乳類の組織から除去されるようである。

固体、あるいは、化学的に受容可能なそれらの塩(塩類)を含む
有する:

L-M

ここで、Mは、原子番号21~31の金属、原子番号39~50の金属、57~71の原子番号を有するランタニド金属、および原子番号72~82の金属からなる群から独立して選択される金属(I)または(III)イオンであり、そして、

Lは、構造式1aの多座有機キレート部分であって:



ここで、

Q、J、X、X'、YおよびZは、それぞれ独立に、-CH₂-(C=O)-O H、またはAがCOOR'である-CH₂-(C=O)NHCH(R)-Aから選択され: Q、J、X、X'、YおよびZのそれぞれのRは、水素、または、アルキル、アリール、アルキレンアリール、アルキレン置換アリール、ヘテロ芳香族、アルキレンヘテロ芳香族、置換ヘテロ芳香族、またはアルキレン置換ヘテロ芳香族を包含する有機構造体から独立して選択されるが、Q、J、YおよびZの少なくとも1つが、-CH₂-(C=O)-NHCH(R)COOR'であり、ここでR'が水素である場合、Rは水素でない。

Q、J、X、X'、YおよびZのそれぞれのR'が、水素、1~7の炭素原子を有するアルキル、フェニルまたはベンジルから独立

して選択され;そして

mは、0、1、2または3から選択され、そして

nは、0または1から選択される、

造影剤。

19. α-アミノ酸(α-アミノ酸類)が、D型またはL型立体配置、またはそれらの混合物から選択される、請求項18に記載の造影剤。

20. Mが常磁性金属イオン(II)または(III)である、請求項19に記載の造影剤。

21. QおよびYが、それぞれ-CH₂-(C=O)NHCH(R)COOR'であり、J、X、X'、およびZが、それぞれ-CH₂-(C=O)OHであり、そして

mおよびnが、それぞれ0である、

請求項20に記載の造影剤。

22. Rが-CH₂-フェニル、そしてR'が水素である、請求項21に記載の造影剤。

23. Mが(III)金属イオンであり、そして

QおよびYが、それぞれ-CH₂-(C=O)NHCH(R)-COOHであり、ここで、Rが、ベンジル、p-ヒドロキシフェニルメチル、2-メチルナフチル、または1-メチルインドリルから選択され;

JおよびZが、それぞれ-CH₂-(C=O)-ORであり、mが0または1であり、そしてXが-CH₂-(C=O)OHであり、そしてnが0である、請求項18に記載の造影剤。

24. 前記金属イオンが、クロム(III)、鉄(III)、コバルト

(III)、ガドリニウム(III)またはマンガン(II)または(III)から選択される、請求項23に記載の造影剤。

25. 以下の群からなる構造式1の化合物の群から選択される請求項18に記載の造影剤L-M:

Mが、鉄(III)、クロム(III)、マンガン(II)、ジスプロシウム(III)またはガドリニウム(III)から独立して選択され;

Qが-CH₂-(C=O)NHCH(R)-COOH、Rが-CH₂-フェニル、J、YおよびZがそれぞれ-CH₂-(C=O)OH、そしてmおよびnがそれぞれ0であり;

Qが-CH₂-(C=O)NHCH(R)-COOH、Rが-CH₂-フェニル、J、X、YおよびZがそれぞれ-CH₂-(C=O)OH、そしてmが1でありそしてnが0であり;

Qが-CH₂-(C=O)NHCH(R)-COOH、Rが-CH₂-フェニル、J、X、X'、YおよびZがそれぞれ-CH₂-(C=O)OH、そしてmおよびnがそれぞれ1であり;

QおよびYがそれぞれ-CH₂-(C=O)NH-CH(R)-COOH、Rが-CH₂-フェニル、JおよびZがそれぞれ-CH₂COOH、そしてmおよびnがそれぞれ0であり;

そして、

QおよびYがそれぞれ-CH₂-(C=O)-NH-CH(R)-COOH、Rが-CH₂-フェニル、J、XおよびZがそれぞれ-CH₂COOH、そしてmが1そしてnが0である。

26. 少なくとも1つのRまたは1つのAが、アリール基、置換アリール基、アルキレンアリール基、アルキレン置換アリ

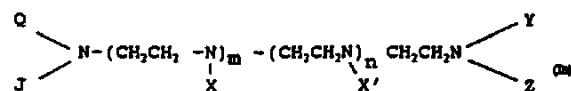
ール基、ヘテロ芳香族基、置換ヘテロ芳香族基、アルキレンヘテロ芳香族基、またはアルキレン置換ヘテロ芳香族基を含む、請求項18に記載の造影剤。

27. 生きている被検体の組織の造影剤として使用可能な組成物であって、該組成物が以下のL-Mあるいは化学的に受容可能なそれらの塩(塩類)を包含する:

L-M

ここで、Mは、原子番号21~31の金属、原子番号39~50の金属、57~82の原子番号を有するランタニド金属、および原子番号72~82の金属からなる群から独立して選択される金属(I)または(III)イオンであり、そして、

Lは、構造式1aの多座有機キレート部分であって:



ここで、

Q、J、YおよびZおよびXおよびX'は、存在する場合、それぞれ独立して、-CH₂-(C=O)-OH、または-CH₂-(C=O)NH-CH(R)-Aから選択され;

ここで、Q、J、X、X'、YおよびZのそれぞれのRは、水素、またはアルキル基、アリール基、置換アリール基、アルキレンアリール基、アルキレン置換アリール基、ヘテロ芳香族基、置換ヘテロ芳香族基、アルキレンヘテロ芳香族基、またはア

ルキレン置換ヘテロ芳香族基を含む有機構造体から、独立して選択されるが、Q、J、YおよびZの少なくとも1つは-CH₂(C=O)-NHCH(R)-Aであり；

Aは、-(C=O)OR¹、-(C=O)-N-(R²)R³、またはR⁴から独立して選択され、ここで、R²は、-CH₂-アリール、-CH₂-置換アリール、-CH₂CH₂-アリール、または-CH₂CH₂-置換アリールから独立して選択されるが、Aが-(C=O)OR¹で、R¹が水素である場合、Rは水素でない；

R¹、R²およびR³は、Q、J、X、X'、YおよびZのそれぞれのA中に存在する場合、水素、1~7の炭素原子を有するアルキル、フェニルまたはベンジルから独立して選択され；そして

mは、0、1、2または3から選択され、そして

nは、0または1から選択される、

組成物。

28. QおよびYが、それぞれ-CH₂(C=O)-NHCH(R)-COOR¹であり、

JおよびZが、それぞれ-CH₂(C=O)OHであり、そして

mおよびnが、それぞれ0である、請求項27に記載の組成物。

29. Rが-CH₂-フェニル、そしてR¹が水素である、請求項28に記載の組成物。

30. Rが(III)金属イオンであり、

QおよびYが、それぞれ-CH₂-(C=O)-NHCH(R)-COOHであり、ここで、Rが、ベンジル、p-ヒドロキシフェニルメチル、2-メチルナフチル、または3-ノルボルニドリンから選択され、

JおよびZが、それぞれ-CH₂(C=O)-OHであり、mが0または1で

)-NHCH(R)-Aであり；そして

Aは、-(C=O)OR¹、-(C=O)-N-(R²)R³、またはR⁴から独立して選択され、ここで、R²は、-CH₂-アリール、-CH₂-置換アリール、-CH₂CH₂-アリール、または-CH₂CH₂-置換アリールから独立して選択されるが、Aが-(C=O)OR¹で、R¹が水素である場合、Rは水素でない；

R¹、R²およびR³は、Q、J、X、X'、YおよびZのそれぞれのA中に存在する場合、水素、1~7の炭素原子を有するアルキル、フェニルまたはベンジルから独立して選択され；そして

mは、0、1、2または3から選択され、そして

nは、0または1から選択される。

34. α-アミノ酸(α-アミノ酸類)が、存在するとき、D型またはL型立体配置、またはそれらの混合物から選択される、請求項33に記載の造影剤。

35. RまたはAの少なくとも1つがアリール基、置換アリール基、アルキレン置換アリール基、アルキレン置換アリール基、ヘテロ芳香族基、置換ヘテロ芳香族基、アルキレンヘテロ芳香族基、あるいはアルキレン置換ヘテロ芳香族基を含む、請求項33に記載の造影剤。

36. ヒトの組織を診断的様式で検査する方法であって、該方法が：

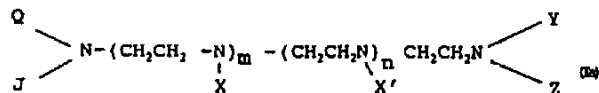
(a)請求項1の造影剤を、約0.5から5000マイクロモル/kg-ヒトの体重までの濃度で1gの化合物の濃度を有する投与量で、ヒトに注入する、工程

あり、そしてXが-CH₂(C=O)ORであり、そしてnが0である、請求項30に記載の組成物。

31. 前記金属イオンが、鉄(III)、コバルト(III)、クロム(III)、ガドリニウム(III)またはマンガン(II)または(III)から選択される、請求項27に記載の造影剤。

32. 約0.5から5000マイクロモル/kg-ヒトの体重までの濃度の注入可能な造影剤として有用である、請求項27に記載の組成物。

33. 構造式1aの多価有機キレート化合物、あるいは、化学的に受容可能なそれらの塩(塩類)：



ここで、

Q、J、YおよびZおよびXおよびX'は、存在する場合、それぞれ独立して、-CH₂(C=O)-OH、または-CH₂(C=O)-NHCH(R)-Aから選択され；

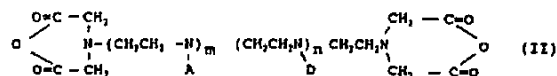
ここで、Q、J、X、X'、YおよびZのそれぞれのRは、水素、またはアルキル基、アリール基、置換アリール基、アルキレン置換アリール基、アルキレン置換アリール基、ヘテロ芳香族基、置換ヘテロ芳香族基、アルキレンヘテロ芳香族基、またはアルキレン置換ヘテロ芳香族基を含む有機構造体から独立して選択されるが、Q、J、YおよびZの少なくとも1つは-CH₂(C=O)-

(b)ヒトを組織中に置き、そして工程(a)の被検体の組織および腔部に、核磁気共鳴が検出されるように高周波エネルギーを照射する、工程、および

(c)得られた画像核磁気共鳴シグナルを分析する、工程を含む、方法。

37. 構造式(1a)の請求項33に記載のキレート化合物を調製する方法であって、該方法が：

(a)II式の構造体：



ここで、AおよびDが、CH₂(C=O)-ORである、

と、上記本明細書で定義した、H₂N-CH(R)-COOR¹である構造体のアミノ酸あるいはエステルあるいはH₂N-CH(R)-COOR²R³である構造体のアミドあるいはNH₂CH₂-CH₂-置換アリールである構造体の誘導体、

ここで、Rはアルキル基、アリール基、アルキレン置換アリール基、ヘテロ芳香族基またはアルキレンヘテロ芳香族基を含む有機構造体であり、そして

R¹またはR²は、水素、1~7個の炭素原子を有するアルキル、フェニルまたはベンジルから独立して選択され、そして

mは、0、1、2または3から選択され、そして

nは、0または1から選択される、

とを、無水炭酸性非プロトン性溶媒中で、約50~150℃の間で

約2〜10時間接触させる。工程：および

(b) 溶媒を除去し、そして構造式Iの化合物を回収する。工程：

を包含する。方法。

38. 下記双極性非プロトン性溶媒が、ジメチルホルムアミド、ジエチルホルムアミド、ヘキサメチルホスホラミド(hexamethylphosphoramide)、ジメチルスルホキシドまたはそれらの混合物から独立して選択され、そして

加熱温度が約90および100℃の間で、時間が約4〜7時間の間である。請求項37に記載の方法。

39. Rが鉄(II)、鉄(III)またはガドリニウム(III)から選択され、QおよびYがそれぞれ-CH₂(C=O)NHCH(R)-(COOR')であり、ここで、Rがベンジルであり、QおよびYのR'がそれぞれ水素であるか、またはQのR'がRでありそしてYのR'がエチルであるか、またはQおよびY中のR'がそれぞれエチルであり、そして

1、X、X'およびZがそれぞれ-CH₂(C=O)OHである。請求項1に記載の造影剤。

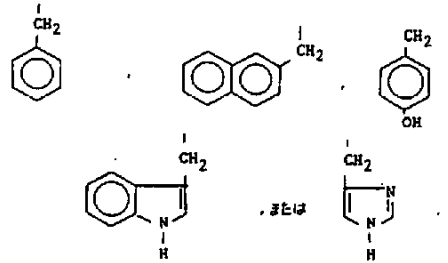
40. Rが鉄(II)、鉄(III)、またはガドリニウム(III)から選択され、QおよびYがそれぞれ-CH₂(C=O)NHCH(R)-(COOR')であり、ここで、Rがフェニルであり、そしてQおよびYのR'がそれぞれ水素であるか、またはQのR'がRでありそしてYのR'がエチルであるか、またはQおよびYのR'がそれぞれエチルであり、そして

1、X、X'およびZがそれぞれ-CH₂(C=O)OHであり、そしてnが

1であり、nが0である。請求項1に記載の造影剤。

41. nが1であり、nが0である。請求項1に記載の造影剤。

42. Rが以下から、独立して選択される。請求項1に記載の造影剤：



明細書

MRI用のアミノ酸、エステルおよび/またはカタコール造影剤

発明の背景

関連する出願

本出願は、1991年8月9日に出願された米国特許出願第743,147号の一部継続出願である1991年8月12日に出願された米国特許出願第744,470号の一部継続出願である。

発明の分野

本発明は、磁気共鳴画像法に有用な肝臓(hepatobiliary)および心臓の造影剤を含有するアミノ酸およびカタコールの調剤および使用に関する。この造影剤は、複数のカルボキシル基を有し、種々の金属(II)または(III)イオンをキレートする。

関連技術の記載

本発明は従来用磁気共鳴画像法(MRI)の造影剤に関する。

造影剤は、通常のインビボMRI信号を、増大または抑制すること、異なる診断情報をもたらす外来性の物質である。理論(1,2)、および種々のタイプの造影剤の使用が、文献(1,2)に記載された。本節中の括弧内のアラビア数字は、本節で引用される論文を指す。

与えられたMRI造影剤の使用は、インビボでのその造影剤の分布により判断される。その初期の生体分布を制御するメカニズムは分類され得る。すなわち分子サイズ、電荷、親油性、

表面特性等の性質にのみ依存する物理化学的なもの、あるいは細胞中または細胞上の特定の受容体への基質の結合に依存する受容体介在性のものである。異なる器官は、同じ造影剤を、異なるメカニズムにより処理し得る。例えば、造影剤の分子サイズにより、それは腎臓により濾過(あるいは血管腔へ封じ込め)され得る。一方、肝臓では受容体介在性輸送によりそれは除去される。

物理化学的な分布メカニズムを示す造影剤は、血漿および細胞外液中に分布するジエチレントリアミン五酢酸のガドリニウム(III)錯体(Gd-DTPA)、およびほとんどが尿管内に残留するアルブミン-(Gd-DTPA)_nを包含する(1,2)。前者は、血液脳関門の損傷を明らかにし、または腎臓の解剖学的構造および機能を明らかにする(3)。一方、後者は、尿管構造を描写し(4)、そして脳血液容量を測定するために(5,6)、実験的に使用されてきた。鉄-ゲキストランは、コロイドだが、十分長い血漿半減期(12時間)を有し、いくつかの超磁気酸化鉄粒子調剤物(6,9)と同様に、尿管内T2造影剤(7)として使用される。

外来性の物質を全身循環から除去する役割を有することから、肝臓は、可溶性で無粒子からなる造影剤を、活発に取り込み濾過し得る。溶質が血漿から胆汁へと辿る経路は絶望されており(10〜11)、図4中に図解した。細胞膜を横切る肝臓内への通過は、以下のことにより起こり得る：飲細胞運動、受動的拡散、および/または胆汁酸、ビリルビン、有機アニオン、有機カチオン、中性有機化合物、または無機イオンを

輸送する、図体を介する系。種々の担体系の基質物質性は、部分的に重複し得る(例えば、有機アニオンおよび胆汁酸)。基質は細胞内で代謝され得、および/または、例えばグルクロン酸あるいはアルタチオンと結合され得る。最後に、毛細血管への排出も、細胞膜の通過を伴う。任意の化合物の胆汁排出のメカニズムは、その取り込みのために機能したメカニズムとは異なり得る。

代謝、胆汁への排泄、腎臓排出の相対的割合により、血漿からの薬剤およびそれらの代謝物質のクリアランスが決定され、そして、任意の1つの器官系に、それらが滞留するかどうかが決定される。しかしながら、現在、ある化合物を胆汁中に、そして池を尿中に排出させる因子は、完全には理解されていない。血漿および輸送体タンパク質への結合に関しては、分子量、極性、および分子構造が、重要である。種に依存し、それ以下では尿排出が優先する一般的な分子量の閾値があるらしい(ラットに関しては約300、そしてヒトに関しては約600)(10~11)。親水親油バランスが、胆汁排出で重要な役割を演じているようである(16~18)。しかしながら、事前の予測は、現在のところ不可能である。

肝臓は、MR造影剤であるFe-ENPG(ENPGは、エチレン-ビス(ヒドロキシフェニルグリシン))の受容体介在性の局在化の最初の例を提供した(12)。その後、他の鉄(13~15)、マンガン(16~17)、およびガドリニウム(18)のキレートが、受容体介在性に肝細胞へ取り込まれる可能性があること、あるいはそ

れが実証されたことが示された。

アニオン性のキレートFe-ENPG、Fe-HBED(HBED = ビス-(ヒドロキシベンジル)エチレンジアミン二酢酸)、およびFe-PGDF(PGDF = N-1-(フェニルグリタリル)アスファリキナミンB)が、BSP(ブロモスルホタレイン)で阻害し得る系または複数の系により肝臓中に輸送される(19,15)ことが他者によって報告された。

親油性キレートGd-DTPA(DTPAの誘導体である「ベンジロキシプロピオニクテトラセテート」)が、かなりの胆汁排出(8時間で胆汁中に注入された投与量の38.6%)を有することが示された(18)。この化合物の輸送のメカニズム(例えば、受動的拡散またはアニオン輸送)の知見については、全く報告されていない。Gd-DTPAは、0.5テスラでのT1強調スピンエコーイメージ法では、Gd-DTPA(18%)よりも大きなシグナルの増強(48%)を生じた。

さらに、他の器官および組織は、例えば、アミノ酸、ペプチドまたはカテコールアミンのようなあるクラスの基質に対して親和性をもつ受容体を有し得る(19-24)。

これらの受容体には、例えば、ペプチド基質中に存在するアミノ酸の誘導体(22)、またはドパミンのような天然のカテコールアミンのアミド誘導体のような、基質に類似する分子もまた結合し得る。本発明の造影剤は、一部分このメカニズムにより局在化し得る。さらに、本発明の造影剤を含有するカテコールの局在化は、一部分それぞれの酸化還元特性に依

存し得る。

今日まで、磁気共鳴画像法(MRI)は、モーションアーチファクト(motion artifacts)および適切な造影剤が無かったことによる画質の低下のために、人間の肝臓および腹部の画像化においては、小さな役割を演じてきた。機械工学(例えば、自己シールドグラジエントコイル)およびパルスシーケンス(例えば、エコープラナー技術およびターボフラッシュ技術)における最近の技術の進歩は、肝および腹部の動きに関する問題を緩和する見込みであり、診断MRIの継続的な進歩のために、造影剤の開発をいっそう重要にする。

MRI造影剤の使用、およびそれらの調整並びに複製の一般的な背景は、例えば、以下に記載されている：

H. Griesら、米国特許第4,647,447号；

R.B. Laufferら、米国特許第4,848,755号および4,880,008号；

B.L. Engelstadら、米国特許第4,909,257号；

D.L. Whiteら、米国特許第4,999,445号。

1. R.B. Lauffer, 「SMR画像法用の、水のプロトン緩和剤としての常磁性金属錯体：理論と設計」*Chem. Rev.* (1987): 87:901-927。

2. S.M. Rocklageら、「磁気共鳴画像法の造影剤」第14章、*In: Magnetic Resonance Imaging*, 第2版, Stark DD, Bradley WC共編, St. Louis: C.V. Mosby Co. (1992)。

3. G. Bydder, 「ガドリニウムDTPAの臨床応用」*In: Magneti*

c Resonance Imaging, Stark DD, Bradley WC共編, St. Louis: C.V. Mosby Co. (1988): 162-200(第10章)。

4. M.E. Moseleyら、「アルブミン-(Gd-DTPA)、胆管内MR造影剤、および投影MR画像法を使用する胆管マッピング」*J. Computer Assisted Tomography* (1988): 13:219-221。

5. T.A. Kentら、「4.7TでのMR画像法による、大脳血管のラットモデルにおける大脳血液容量」*AJNR* (1989): 10:335-358。

6. D.L. Whiteら、「胆管内MR造影剤を使用する灌流された大脳血液容量の測定」*Book of Abstracts: Society of Magnetic Resonance in Medicine* (1989): 2:606。

7. D.L. Whiteら、「磁気感受性造影剤としての鉄-デキストラン：正常ラットおよびネコの脳のT2強調スピンエコーMRIにおける流れに關係するコントラスト効果」*Magn. Reson. Med.* (1992), 第24巻, 14-18頁。

8. D.L. Whiteら、「長寿命の超常磁性MRI造影剤であるフェロソーム(ferrosomes)の動態クリアランス」*Book of Abstracts: Society of Magnetic Resonance in Medicine* (1990): 1:516。

9. R. Weisslederら、「超小型超常磁性酸化鉄：MR画像法用の新しいクラスの造影剤の特性」*Radiology* (1990): 175:489-493。

10. L.S. Schanker, 「胆汁への有機化合物の分泌」*In: The Handbook of Ph the structure Physiology, Alimentary Canal V*, Washington, D.C.: American Physiol. Society, Ch

9. 114:2413-2419.
11. C.D. Klaassenら、「胆汁生成、肝臓の取り込み、および胆汁排出のメカニズム」Pharmac. Rev. (1984); 35:1-67.
12. R.B. Laufferら、「肝臓MR造影剤としての鉄-EPDG: 初期画像および生体内分布の研究」J. Computer Assist. Tomogr. Graph. (1985); 9:431-438.
13. B. Boernerら、「肝臓官能性の評価用の磁気共鳴造影剤としての鉄-HEEDおよび鉄-EPDGの評価」J. Magn. Reson. Imag. (1991); 1:357-362.
14. K.A. Muellerliesら、「磁気共鳴造影法用の肝臓造影剤としてのフェリオキサミンB誘導体」Magn. Reson. Med. (1991); 第22巻、84から100頁。
15. B. Boernerら、「磁気共鳴造影法造影剤、鉄(III)-W-(2-フェニル-グルタリル)デスフェリオキサミンBの肝臓輸送」Magn. Reson. Med. (1990); 11:509-516.
16. D.L. Whiteら、「新MRI造影剤、マンガン-ジピリドキサル二磺酸(Mn-BDPD)のクリアランス、排出、および器官分布」Abstract Book: Society of Magnetic Resonance in Medicine(1988) 1:533。
17. S.W. Young、「新MRI造影剤、マンガンジピリドキサル二磺酸、マンガン/ピリドキサル(pyridoxal)5-磺酸キレートを使用する肝細胞の毒性のMRI測定」Magn. Reson. Med. (1989); 10:1-13。
18. P. Pavoneら、「ラット肝臓のMRI画像法におけるGd-BOP

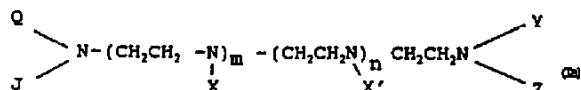
發明の要旨

本発明は、磁気共鳴画像法用造影剤であって、該造影剤が以下の構造、あるいは、化学的に受容可能なそれらの塩(塩類)を含有する：

1.-M

ここで、H12、原子番号21~31の金属、原子番号39~50の金属、57~71の原子番号を有するランタノイド金属、および原子番号72~82の金属からなる群から独立して選択される金属(1)または(11)イオンであり、

しは、構造式12の多座有機キレート部分であって：



८८८.

Q、J、K、X'、YおよびZは、それぞれ独立して、 $-CH_2(C=O)-OH$ 、または $-CH_2(C=O)NHCH-(R)-(A)$ から選択され;

ここで、O、N、X、YおよびZのそれぞれのRは、水素、またはアルキル基、芳香族基、置換芳香族基(substituted aromatic)、アルキレン芳香族基、アルキレン置換芳香族基(alkylene substituted aromatic)、ヘテロ芳香族基、置換ヘテロ芳香族基(substituted heteroaromatic)、アルキレンヘテロ芳香族基、またはアルキレン置換ヘテロ芳香族基(alkylene substituted heteroaromatic)を包含する有機構造体から選

TAとGd-DTPAとの比較」Radiology (1990);176:61-64.

19. P. Ascher, 「グルタミン酸能受容体およびグルタミン酸-
シナプス (glutamatergic synapses)」 Receptors, Mem-
brane Transport and Signal Transduction 中, A. E. Evans
編纂, Berlin: Springer Verlag, (1989):127-146。
20. F.P. Lehman, 「生物学における立体選択的分子認識」 R-
eceptors and Recognition 中, 第5巻, シリーズA, Cuatrec-
asas PおよびGreaves WF, London: Chapman-Hall(1978)。
21. R.D. O'Brien編纂, The Receptors, A Comprehensive
Treatise, 第1巻, New York: Plenum Press(1979)。
22. S.S. Schiffman, 「甘味覚を媒介する受容体の探索」
The Receptors 中, 第4巻, Conn PM編纂, Orlando: Academic
Press(1986)。
23. A.S. Horna編纂, The Neurobiology of Dopamine, Aca-
demic Press, New York, 1979。
24. B.J. Clark, 「末梢でのドパミンの役割」 The Dopamine
nic System 中, B. Malassa編纂, Springer-Verlag, Berli-
n, 1985, 27-29頁

本出願中に引用される全ての参考論文、特許、などは、そのまゝの形で参考として、本明細書中に援用される。

肝臓、胆管樹(biliary tree)、上部小腸。または心筋組織のMRI画像法に対し特異的な有機+レート金属イオン錯体を待つことは非常に有用である。本発明は、これらの有用な場所を有する錯体および方法を提供する。

扱われるが、Q、J、YおよびZの少なくとも一つは $-\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})-\text{NHCH(R)}-\text{A}$ であり；そして

Aは、 $-(C=O)OR^1$ 、 $-(C=O)-H$ 、 $(R^2)^2$ 、または R^2 から独立して選択され、ここで、 R^2 は、 $-CH_2$ -アリール、 $-CH_2$ -置換アリール、 $-CH_2CH_2$ -アリール、または $-CH_2CH_2$ -置換アリールから独立して選択されるが、 A が $-(C=O)OR^1$ で、 R^1 が水素である場合、 R は水素でない；

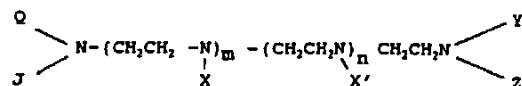
R^1 、 R^2 および R^3 は、Q、J、X、X'、Y および Z のそれぞれの A 中に存在する場合、水素、1~7 の炭素原子を有するアルキル、フェニルまたはベンジルから独立に選択され；そして

は、0、1、2または3から選択され、そして

n は、0 または 1 から選択される。

連影劇、に関する。

他の面では、本発明は、以下の構造式Iの多座有機チレート化合物、あるいは調学的に受容可能なそれらの塩(塩類)：



ここへ、

0、J、X、X'、YおよびZは、それぞれ独立に、 $-\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})-\text{O}$
H、または $-\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{NHCH}-(R)-(A)$ から選択され；

Q、J、I、X'、YおよびZのそれぞれのRは、水素から、または、Q、J、YおよびZの少なくとも1つが、 $-CH_2(C=O)-NHCH(R)$

)-Aであるアルキル基、芳香族基、置換芳香族基、アルキレン芳香族基、アルキレン置換芳香族基、ヘテロ芳香族基、置換ヘテロ芳香族基、アルキレンヘテロ芳香族基、またはアルキレン置換ヘテロ芳香族基を包含する有機構造体から、独立に選択され；そして

Aは、 $-(C=O)OR^1$ 、 $-(C=O)-N-(R^2)R^3$ 、または R^4 から独立して選択され、ここで、 R^1 は、 $-CH_2$ -アリール、 $-CH_2$ -置換アリール、 $-CH_2CH_2$ -アリール、または $-CH_2CH_2$ -置換アリールから独立して選択されるが、Aが $-(C=O)OR^1$ で、 R^1 が水素である場合、Rは水素でない；

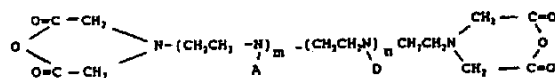
R^1 、 R^2 および R^3 は、0、1、2、3、4、5および6のそれぞれのA中に存在する場合、水素、1~7の炭素原子を有するアルキル、フェニルまたはベンジルから独立して選択され；そして

nは、0、1、2または3から選択され、そして

mは、0または1から選択される、に關する。

他の面では、本発明は、構造式(1a)のキレート化合物を調製する方法であって、該方法が：

(a) 11式の構造体：



ここで、AおよびBが、それぞれ $-CH_2(C=O)-OH$ である、と、上記本明細書で定義した、 $H_2N-CH(R)-COOR^1$ である構造体のアミノ酸あるいはエステルあるいは $NH_2CH_2CH_2$ アリールある

いは置換アリール、

ここで、Rはアルキル基、芳香族基またはヘテロ芳香族基を包含する有機構造体であり、そして

R^1 は、水素、1~7個の炭素原子を有するアルキル、フェニルまたはベンジルから選択され、そして

nは、0、1、2または3から選択され、そして

mは、0または1から選択される、

とを、無水塩性非プロトン性溶媒中で、約50~150℃の間で約2~10時間接触させる、工程；および

(b) 溶媒を除去し、そして構造式(1)の化合物を回収する、工程、を包含する方法にも關する。

これらの金属イオンキレートは、心臓、肝臓、胆管樹、および上部小腸で、T1コントラスト効果をもたらす。これらの効果により、機能および、解剖学的構造が明らかになる。これらの造影剤は、毒性が低い。そして、超常磁性微粒子由来の鉄とは異なり、これらの化合物由来の金属は、迅速にそして比較的完全に体内から排除される。そのため、これらの造影剤は、有用な腹部MRIに対して、非常に重要のあるものである。

図面の簡単な説明

図1 A、1 B、1 Cおよび1 Dは、それぞれ化合物BOPTA、BSP、DPBP、DTPAの構造の表示である。

図2 A、2 B、2 Cおよび2 Dは、それぞれキレートEDTA、EOTF、ENPG、BBEDの構造の表示である。

図3は、ビスアミノ酸置換キレートを生成する一般的な反応の化学種の表示である。

図4は、肝臓管領域で検出された細胞、構造物および経路の断面の表示である。

図5 Aは、Gd-DTPA-(ビスフェニルアラニン)注入後の種々の時間(分で表示)における、ラットのT1強調磁気共鳴画像の写真である。投与量約0.1mmol/kg。

図6 Aは、Gd-DTPA-ビス(フェニルアラニンエチルエステル)について、図5 Aおよび図5 Bと同様にして得られた種々の時間(分で表示)におけるT1強調磁気共鳴画像の写真である。

図5 Bおよび6 Bは、それぞれ図5 Aおよび6 Aの映像の注入前および注入9分後の拡大写真である。

図7は、以下の実施例8に記載されるGd-DTPA-ビスフェニルアラニン(ビス酸)を約0.1mmol/kgの投与量で同時注入した後、種々の時間(分で表示)における2匹のマウスを、並べて表示したT1強調磁気共鳴画像の写真である。これらの画像は、心臓の位置での前断面(coronal plane)の2mm厚のスライスである。心臓、肝臓および肺がはっきりとしている。

図8は、Gd-DTPA-ビス(フェニルアラニンエチルエステル)の異なる調製物が用いられた以外は、図5で得られたのと同様のT1強調磁気共鳴画像の写真である。

図9~13は、それぞれ心臓、肺、腎臓、肝臓および骨格筋組織のMRI画像法のグラフ表示である。Gd(III)-DTPA-(3HTA)およびGd(III)-DTPA-(DMPE)について、5増強を時間(分)

に対して示している。

図14 Aは、Gd(III)-DTPA-(3HTA)を使用して、図5で得られたのと同様のラットのT1強調MRI画像の写真である(分で表示)。

図14 Bは、図14 Aに表示されたと同様の、腎臓の位置での第2前断面の写真である。

図15 Aは、Gd(III)-DTPA-(DMPE)を使用して、図5で得られたのと同様のラットのT1強調MRI画像の写真である(分で表示)。

図15 Bは、図15 Aに表示されたと同様の、腎臓の位置での第2前断面の写真である。

図16~20は、それぞれ心臓、肺、腎臓、肝臓および骨格筋組織のMRI画像法のグラフ表示である。Gd(III)-DTPA-(L-PheOEt)およびGd(III)-DTPA-(D-PheOEt)について、5増強を時間(分)に対して示している。

図21 Aおよび21 Bは、それぞれGd(III)-DTPA-(L-PheOEt)およびGd(III)-DTPA-(D-PheOEt)を用い、図14および図15で得られたのと同様のラットのT1強調MRI写真画像である。しかしながら、投与レベルは、0.05mmol/kgである。

図9~13および16~20では、グラフ中の垂直線は、水平線の両端の端を示している。この垂直線の中央のボックス(box)は、各点での観測の平均値である。垂直線の両端の水平線は、中央の値から1標準偏差(derivation)のところに置かれている。

発明の詳細な説明および好適な実施例

定義

本明細書中に使用されるとき:

「アルケレン」は、メチレン、エチレン、プロピレン等、4炭素単位までの類似物を示す。

「アミノ酸」は、一般的に、生きている被検体または哺乳類に見出されるα-アミノ酸の類を示す。しかしながら、天然には見出されない合成α-アミノ酸もまた有用である。さらに、別々のケラル異性体としてのこれらのD-およびL-アミノ酸は、それぞれに有用である。D-およびL-異性体の混合物も、本発明において研究された。

「原子番号21から29の金属」とは、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛およびガリウムをそれぞれ指す。常磁性イオンが、特に好適である。鉄、マンガン、ニッケル、クロム、コバルトが、好適である。

「原子番号57〜71を有する金属(ランタニド)」は、それぞれランタン(lanthanide)、セリウム、プラセオジムなどから、ルテチウム(lutetium)までを指す。常磁性ガドリニウム(III)またはジスプロシウム(III)が、好適である。

本発明の造影剤は、いくつかの器官系に局在化する。例えば、腎臓、尿路、および膀胱中; 肝臓、胆管樹、腸管内腔中; および心筋中である。この局在化は、結果的にMRIシグナルおよび画像コントラストを増加させる。得られる画像は、

物(higher analog)には、カップリング剤および過剰量のアミノ酸のまたは保護されたアミノ酸の使用のような強制的な条件が必要とされ得る。

どんな無水双極性非プロトン性溶媒も、合成に使用し得る。ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルアセトアミド、アセトニトリル等が有用である。DMFは好ましい。反応混合物を、70〜100℃で2から12時間、好適には90〜100℃で4〜5時間、特別には6時間、加熱する。

反応混合物を、冷却し、そして従来のロータリーエバポレーターまたはその相当物を使用して、溶媒を除去する。1つの側面では、本発明は、構造式Iの化合物の新規な調製に関する。

金属イオンキレート錯体(L-M)の調製

キレート金属イオン錯体、L-Mの調製の一般的記載は、従来技術である。上記参考文献を参照せよ。

金属キレートは、適当な水性または有機溶媒中で、金属塩または金属酸化物と、キレートリガンドとを、適切な化学量論比で反応することにより、典型的には調製される。時には、温度を上げることが必要とされる。次いで、反応混合物のpHは、増基を用いて調整され、対応するキレート塩を得る。あるいは、プロトン化されたキレートを得るために、しばしば、酸が使用され得る。

R¹は、芳香族基、アルケレン芳香族基、置換芳香族基またはヘテロ芳香族基から独立して選択されることが望ましい。

同上的解剖学的微細構造を示し、そして特定の器官系、例えば、泌尿器系および胆管系の機能状態を確認することの両方を可能にする。

この局在化は、おそらく物理化学的および受容体ベースのメカニズムの組み合わせに関連する。例えば、血液成分への結合は、血液プールの解離能増加を引き起こし、心臓の解離能増加に寄与し得る。肝臓への局在化は、肝細胞による認識および輸送に起因し得る。また、他のメカニズムも関係し得る。金属キレート造影剤の構造の選択的改変により、他の器官および組織をターゲットにすることも可能であり得る。

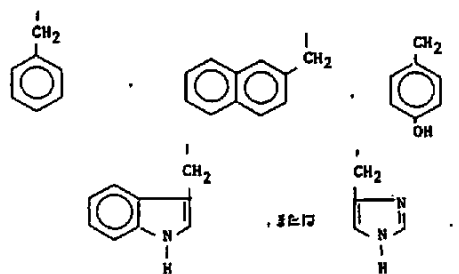
(エステル基を有する)アミノ酸含有のキレート(L)の調製

以下は、キレートリガンドLの合成の概観である。詳細な記載は、実施例(Experimental Section)にある。

構造式Iの化合物の合成で、前駆体は、例えば、D、L、またはそれらの混合物のような周知の天然または合成のアミノ酸の構造を有するアミノ酸と接触したDTPA-ビス無水物(または類似構造物、例えばEDTA-ビス無水物)であり得る。一般的に、1つのアミノ酸残基だけが、Q、J、X、X'、YまたはZで示される1つまたはそれ以上の位置に加えられる。すなわち、ポリペプチド結合は、通常、形成されない。

ビス無水物と共に、少量(例えば、0.5当量)のアミノ酸が使用される場合、モノアミノ酸誘導体の生成が、優先する。次いで、2当量のアミノ酸が使用される場合は、ビスアミノ酸誘導体が生産される。DTPAまたはポリカルボン酸の高級類似

特に好適なものは、以下のアリール芳香族基である:



Q、J、X、X'、YおよびZのそれぞれの中のキレートリガンドLのR¹基は、以下から独立して選択される: H(酸)、1〜7の炭素原子を有するアルキル(モノ、ジ、トリ、などの酸エステル)、シクロフェニル、フェニル、ベンジルまたは1-あるいは2-ナフチルのような環状基。

常磁性金属イオンが好適であり、鉄(II)および(III)並びにガドリニウム(III)が特に好適である。

アミノ酸アミド構造

他の実施態様において、本発明は、Aが-(C=O)N(R²)R³から独立して選択される特定の構造体に関し、ここでR²およびR³は、R¹について規定された群からそれぞれ独立して選択され

る。

一般的安全性

アミドおよび関連する構造体(遊離アミド、モノ置換アミドまたは少置換アミド)は、適切なアミノ酸アミド(通常、ハイドロクロライド)を用いて開始することにより生成される。

アミノ酸の何らかの精製が、必要であり得る。

次いで、アミノ酸エステルについて上述したように、アミノ酸アミドを、対応する二無水物と接触させる。1当量以下の量のアミノ酸アミドを、溶液中で高度に希釈して用いる場合、モノアミノ酸アミドが、優先的に生成する。化学量論的に過剰量のアミノ酸アミドを用いれば、ジアミノ酸アミド構造体を得られる。

アミド構造体は、実施例12~22中にも記載されている。これらのアミド構造体は、MRIにおいて有用である。なぜなら、それらの構造体は、特定の組織に対し良好なコントラスト特性を有し、且つ、哺乳類の系で、より長い有用な半減期を有するからである。

置換アルキレンアリアル誘導体

他の側面においては、本発明は、EDTAおよびDTPAタイプの構造体の置換アルキレンアリアル誘導体(例えば、メチレンカテコール類)に関する。

アリアル基および置換アリアル基は、R¹基の一部として定義される。対応するアミノ酸エステルまたはアミドについての記載と同様に、H₂CCH₂CH₂-置換アリアルをビス無水物と接

触させると、期待する化合物が得られる。アリアル基の置換基が水酸基であるとき、水性増善は、避けるべきである。

さらに詳細には、本発明は、1またはそれ以上のカテコールアミド基をもつキレートリガンドを調整すること、有用な金属イオンを用いてこのリガンドの安定なキレートを作ること、および診断用画像法または分光法に、このキレートを使用することにも関する。この金属イオンが、例えば、Gd(III)またはDy(III)のような常磁性体である場合、キレート剤はMRIでコントラスト増加を生じ得、あるいは、シフト、幅の広がり、または磁気共鳴スペクトルでの他の変化を引き起こし得る。

これらの新規の物質は、天然にあるカテコールアミン類に対するそれらの類似性、および/または、酸化還元並びに他の物理化学的特性に基づいて特定のタイプの組織に局在する傾向のある先行技術を改善する。特に、ドパミン(3-ヒドロキシチラミン)すなわち(3-HTA)の2つの誘導体、DTPA-ビス(3-ヒドロキシチラミド)、およびDTPA-ビス(3,4-ジメトキシフェニルアミド)が、有用である。これらのリガンドを、Gd(III)と反応させ、キレートである、DTPA-(3-HTA)₂およびGd-DTPA-(3,4-DMP)₂をそれぞれ生成した。これらは、実施例中に記載するように、ラットのMRIで造影剤として使用された。両方のキレートとも、心臓、肺、腎臓及び肝臓の有用な増強(enhancement)を示した。しかしながら、前者は心臓を選択的に増強した。

磁気共鳴画像法

ヒトの器官および組織のインビボ磁気共鳴画像法は、従来技術であり、十分に確立されている。

図5は、投与量0.1mmol/kg体重のGd-DTPA-ビス(フェニアラニン)の注入前、および注入後0、5、10、15、25、45および60分に得られたラットのT-1強調磁気共鳴画像法の写真である。この画像は、前頭面の10mm×10mm×3mm厚のスライスである。及ぶ領域は、心臓のすぐ上から肝臓のやや下までである。注入前および8分後の拡大画像を、図5Bに示す。画像化パラメーターは、図の左側に示され、反復時間(3000000マイクロ秒)、スキャン時間(6000マイクロ秒)、シグナル平均値の数(4)、および画像マトリックスサイズ(128×256)を含む。シグナル強度の増大が、特に心臓および肝臓で、容易にはっきりとなる。腸管内腔のシグナル強度の増大が、25分およびその後の画像において特に明瞭となり、その器官内に造影剤が排出されたことが示唆される。

図5Aおよび5Bは、Gd-DTPA-ビス(フェニアラニンエステル)が造影剤として使用されたこと以外は、図5Aおよび図5Bで記載されたと同様にして得られたT-1強調磁気共鳴画像の写真である。この化合物は、図5Aおよび図5Bで示された増強と比較した時、肝臓および心臓で異なる明瞭な増強をもたらすことを留意が必要である。これらの結果は、2つの化合物が、かなり異なる生体内分布および薬物動態を有することを示唆する。

個別の実験を、以下の実施例に詳細に記載する。

造影剤の投与

医師であればだれでも、この造影剤の最善の投与方法を決定し得る。一般的に、静脈内への注射が使用される。

本明細書中に記載の造影剤は、被験体、例えば、動物、哺乳類、特にヒトの心臓、肝臓、胆管樹、膀胱および肺の磁気共鳴画像法に有用である。

以下の実施例は、本発明を、さらに説明および記述するために提供される。いかなる点においても、それらは、限定するものと解釈されるべきではない。

(以下余白)

実施例 1

DTPA-ビス(フェニルグリシン)の調製

マグネティックスターラーおよび逆流冷却器を備え、油浴で加熱された50-mL丸底フラスコに、DTPA-ビス(無水物)(Aldrich Chemical Co.)1.10g(3.08mmol)、d,l-α-フェニルグリシン(Pilka Chemical Co.)0.93g(6.15mmol)、および乾燥ジメチルホルムアミド(DMDF)(Aldrich Chemical Co.)25mLを入れた。反応混合物を、90~100℃に加熱し、その温度範囲内に4時間保った。次いで、それを室温にまで自然冷却し、ロータリーエバポレーターを使用して、溶媒を除去した。残留物を、エーテルを用いた摩擦(trituration)により、洗浄し、構造式1bの白色固体2gを生じた(図3)。

実施例 2

DTPA-ビス(フェニルグリシン)のGd(III)錯体の調製

水1mL中に実施例1のDTPA-ビス(フェニルグリシン)2mg(30μmol)を増加した溶液を、GdCl₃・6H₂O(4mg(38μmol))で処理した。生成物のpHを、希水酸化ナトリウム溶液の添加により7.0に調整した。0.22μmのフィルターで濾過して、不溶性のGd(OH)₃を、反応混合物から取り除いた。0.23mLおよび37℃での、生成した溶液(体積1.3mL)のT1緩和時間は、7.1ミリ秒(ms)だった。

実施例 3

Gd-DTPA-ビス(フェニルグリシン)を使用する

ラットの磁気共鳴画像法

実施例 4

DTPA-ビス(L-フェニルアラニンエチルエステル)の調製

L-フェニルアラニンエチルエステルハイドロクロライド4.6g(20mmol; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を、水15mLに溶解し、そして炭酸水素ナトリウム飽和溶液35mLで処理した。生成した溶液をメチレンクロライド10mL量で4回抽出し、そして有機抽出物を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。次いで、乾燥したメチレンクロライド溶液を濾過し、残った乾燥剤を除去した。そして、濾液をロータリーフラッシュエバポレーター(rotary flash evaporator)を使用して、油状に濃縮した。さらに、この残留物を高減圧下で数時間乾燥し、3.75gの遊離塩基を生成した。

DTPA-ビス(無水物)2.85g(8.0mmol)、ジメチルホルムアミド(DMF)10mL、およびジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)4.2mL(24mmol)を、マグネティックスターラーを備えた50mL丸底フラスコ中で、化合させた。上記フェニルアラニンを、DMF10mL中に溶解し、生成した溶液を注射器でフラスコに加えた。反応混合物を40℃に加熱し、次いで外部から加熱しない周囲温度で、13時間攪拌した。

13時間後、反応混合物を高減圧下で濃縮し、粘性残留物を生成した。この物質を、アセトン100mLと共に摩擦し、そして生成した混合物の揮発性成分を、減圧下で除去した。固体残留物を、60/40の水/エタノールの混合物125mLから再結晶させ

300gの雄スプレーグ-ドーリーラット(Sprague-Dawley rat)に、塩酸ケタミンおよびジアゼパムの混合物を腹腔内に注射して麻酔し、外側尾静脈(lateral tail vein)中に、カテーテルを挿入した。次いで、そのラットを、2スライメージー分光計システム(2-Tesla imager spectrometer system)(GE CSI; General Electric Co., Fremont, California)のボア内の内径(1.4)5-cmのイメージングコイル中に置いた。前肢部での動物腹部のT1強調スピンエコー画像が得られた(TR 335ミリ秒; Te 15ミリ秒; 128 × 256映像マトリックス; HEX = 4; 3mmスライス厚)。次いで、実施例2に記載のGd-DTPA-ビス(フェニルグリシン)溶液1.0gを、カテーテルを通して注入した。注入後の一連の画像が得られた。これらの画像は、肝臓では初期にわずかの増強を示した。この肝臓での増強が、時間と共に減少するにつれ、ラットの小编就での強度の増加が観察され、造影剤の肝臓管輸送を示した。強度データを、以下に要約する。

表1

画像の対数強度の増強

時間 (注入後の分)	肝臓	小腸	筋
0 - 3	4	14	19
15 - 18	7	42	2
30 - 33	2	32	6

た。白色の結晶性の生成物を、冷却エタノール25-mL量で2回洗浄し、そして洗浄された固体を、40℃で1時間減圧下で乾燥し、3.6gを得た(理論値の50%)。

分析的に純粋な生成物は、上記結晶1gをエタノール75mL中に40~55℃で溶解し、生成した溶液を脱色炭(decolorizing charcoal)で処理し、炭層を濾過で除去し、そして濾液を氷浴中で冷却することによって得られた。次いで、種結晶を加え、45分後に、濾過により、再結晶した固体0.6gを単離した。

分析: C₂₆H₂₉N₅O₁₂の計算値: C, 58.13; H, 6.64; および N, 9.42。検出値: C, 57.75; H, 6.57; および N, 9.36。

実施例 5

DTPA-ビス(L-フェニルアラニンベンジルエステル)の調製

DTPA-ビス(フェニルアラニンベンジルエステル)を、L-フェニルアラニンベンジルエステル-pトルエンスルホン酸塩4.28g(10mmol; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)から、(実施例4に従って)同様に調製した。エタノールの代わりに酢酸エチルを、再結晶のために使用した。収量は、2.4g(理論値の75%)だった。

実施例 6

DTPA-ビス(L-フェニルアラニン)の調製

メタノール15mL中のDTPA-ビス(フェニルアラニンベンジルエステル)1.23g(1.42mmol)の溶液を、パラジウム/炭素触媒(Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI)0.1gと、25mL丸底フラスコ中で一掃にした。この混合物を、水素ガスを用いて1気

圧で6時間処理した。次いで、反応混合物を、珪藻土濾過剤のベッドで濾過した。揮発性成分を、減圧から減圧下で除去した。生成物の収量は、0.34g(理論値の97%)で、生成物は高分散性を有する白色固体であった。

分析: $C_{22}H_{21}N_4O_{12} \cdot 2H_2O$ の計算値: C, 53.10; H, 5.27; および N, 9.48。検出値: C, 53.13; H, 5.24; および N, 9.32。

HPLCにより測定された時は、以下の図8に関する記載を参照せよ。生成物は、10%のビス酸、45%のビスエステル、および45%のモノ酸モノエステルであることが分かった。これは、図6のMRI画像に実際に使用された造影剤である。

実施例7

ビス(フェニルアラニン)およびそのエステルの

ゴドリニウム(111)キレート の調製

(a) 水4mL中のDTPA-ビス(フェニルアラニン)0.176g(0.25mmol)の溶液をGdCl₃(Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) 0.093gで処理した。生成した溶液のpHを、水酸化ナトリウム水溶液で7.0に調整した。体積を水で5.0mLに調整し、この溶液を滅菌血清バイアル中に0.22ミクロン紙面フィルターを通して濾過した。生成した0.05M溶液は、小動物の撮像法に好適である。

0.25テスラの磁場強度および37℃での、上記溶液の5倍希釈液のT1緩和時間は、21ミリ秒だった。

(b) DTPA-ビス(フェニルアラニン)モノおよびビスエステルが、同様の方法で調製された。

表2

画像の対象領域の%増強

時間 (注入後の分)	肝臓	小腸	腸
0 - 3	51	42	14
5 - 8	60	27	3
15 - 18	47	25	12
25 - 38	50	22	12
45 - 48	34	9	10
60 - 63	33	12	2

実施例9

Gd-DTPA-ビス(フェニルアラニン)エステルを使用する

ラットの磁気共鳴撮像法

この撮像法は、実施例8と同様にして実施された。強度データを以下に要約する。

(以下余白)

実施例8

Gd-DTPA-ビス(フェニルアラニン)を使用する

ラットの磁気共鳴撮像法

100gの雄スプレーグ・ドーリーラットに、増強剤タリウムおよびジアゼパムの混合物を腹腔内に注射して麻酔し、外側尾静脈中に、カテーテルを挿入した。次いで、このラットを、2チャンネル分光計システム(GE CSI; General Electric Co., Fremont, California)のボア内の内径(1.4)3cmのイメージングコイル中に置いた。前腹部での動物腹部のT1強調スピンエコー画像が得られた(TR 300ミリ秒; Te 4ミリ秒; 128 × 256画像マトリックス; 80% = 4; 3mmスライス厚)。次いで、実施例7に記載のGd-DTPA-ビス(フェニルアラニン)溶液0.6gを、カテーテルを通して注入した。注入後の一連の画像が得られた。これらの画像は、肝臓および心臓では、初期にわずかな増強を示した。この増強が、時間と共に水分減少するにつれ、ラットの小腸中の強度増大が観察され、造影剤の肝臓排泄を示した。強度データを以下に要約する。強度の値は、呼吸運動および他の小さなアーチファクトのために、若干の変動を示す。

(以下余白)

表3

画像の対象領域の%増強

時間 (注入後の分)	肝臓	小腸	骨髄
0 - 3	70	86	50
5 - 8	109	46	30
15 - 18	113	66	31
25 - 38	99	48	28
45 - 48	71	49	18
60 - 63	44	35	16

実施例10

(ビスPHE酸約10%)図7

雄のBALBマウス2匹を、スライス厚が2mmであること以外は、実施例8で見られるのと同一の装置、同一の条件で、横に並べて撮像化した。0分〜2.5時間までの図解された時間経過で、造影剤は、まず肝臓中(例えば、2分)、次いで胆臓中(例えば、90分)、そして腸内腔中に(2〜2.5時間)局在化することを認め得る。これは、膀胱中にも認められ得る。

実施例11

マウスの比較MRIデータ

図8は、Gd-DTPA-(Phe-Et)₂の異なる調製物が使用されたこと以外は、図6と同様にして得られたT1強調磁気共鳴撮像の写真である。

BPLC(4.8 × 150mm PRP-1)カラム; 移動相-25ミリモルのギ酸アンモニウム(ammonia formate)水溶液(溶媒A)および50/50(V/V)のアセトニトリル/水(溶媒B)、15分間で10%から95%となるようにプログラムされ、次いで95%に維持; 流量1ml/分; UVおよび/または放射能同位体検出器により測定されたとき、図6で造形剤として使用された物質は、Gd-DTPA-(Phe)₂(約45%)、Gd-DTPA-(Phe-Et)(Phe)(約45%)、およびGd-DTPA-(Phe)₂(約10%)の混合物に、部分的に加水分解されたことが見出された。

pHを慎重に中性に調整し、冷却下で保存された、新たに調製された物質を測定した結果、約90%がGd-DTPA-(Phe-Et)₂であり、残りは、ほとんどがGd-DTPA-(Phe)(Phe-Et)であった。

更に純粋な調製物は、図8に示される(それぞれ、84および53%)と同様に、心臓および肝臓に増強(それぞれ、74および143%)をもたらした。従って、肝臓の増強の程度は、約3倍大きかった。

これらの結果は、エステル化されたDTPAアミノ酸サレートが、低コントラストの増強に特に有益であり得ることを示唆する。

実施例12

DTPA-ビス(D-フェニルアラニンエチルエステル)の調製

DTPA-ビス(D-フェニルアラニンエチルエステル)を、D-フェニルアラニンエチルエステルおよびDTPA-ビス(無水物)から対応するL-異性体を調製(実施例4)したのと同様にして調製した。

溶媒の蒸発により得られた残留物を、水のメタノール溶液(10mL、20% V/V)に溶解し、目的の生成物を、最小量のアセトニトリルの添加により析出させた。生成した白色の懸濁液を冷凍庫(-20℃)で一晩冷却し、次いで、溶媒をデカンテーションで除去した。生成物を高減圧(0.05トル、48時間)下で、P₂O₅およびH₂Oで乾燥し、分析的に純粋な白色固体1.38g(39%)を得た。

分析: C₃₂H₄₀N₇O₁₀・0.5H₂Oの計算値: C, 56.50; H, 6.69; N, 13.57。検出値: C, 56.34; H, 6.81; N, 13.66。

実施例14

DTPA-ビス(フェニルアラニンアミド)および

DTPA-ビス(フェニルアラニンジメチルアミド)の調製

タイトルの化合物を、DTPA-ビス(無水物)およびL-フェニルアラニンアミドハイドロクロライドおよびL-フェニルアラニンジメチルアミドから、ジメチルアミド化合物(実施例13)と同様にして、それぞれ収率10%および59%で調製した。

アミドC₃₂H₄₀N₇O₁₀・2H₂Oの計算値: C, 53.25; H, 8.57; N, 13.58。検出値: C, 53.43; H, 8.30; N, 13.59。

ジメチルアミドC₃₀H₃₈N₇O₁₀の計算値: C, 56.90; H, 7.03; N, 12.90。検出値: C, 56.82; H, 6.74; N, 12.76。

実施例15

DTPA-ビス(3-ヒドロキシテトラミド)

(「DTPA-(3-HA)₂」)の調製

DTPA-ビス(無水物)(3.57g; 3.00mmol; Aldrich Chemical

収率は、55%であった。

分析: C₁₆H₂₆N₆O₁₂の計算値: C, 58.13; H, 8.64; N, 9.42。検出値: C, 57.87; H, 8.55; N, 9.46。

実施例17

DTPA-ビス(フェニルアラニンメチルアミド)の調製

L-フェニルアラニンメチルアミドハイドロクロライド2.07g(10.41mmol)の酢酸エチル(75mL)懸濁液を、炭酸ナトリウム(20mL)の飽和水溶液で処理した。生成した溶液を、酢酸エチル(2 × 75mL)で抽出し、化合した有機抽出物を、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過で乾燥剤を除去し、そして濾液をロータリーエバポレーターを用いて油状に濃縮した。さらに、この残留物を、高減圧下で一晩P₂O₅で乾燥し、白色固体のアミン1.72gを生成した。

乾燥されたアミンの無水ピリジン(15mL)溶液を、アルゴン存在下で、DTPA-ビス(無水物)(1.80g, 5.04mmol)と化合させた。反応混合物を、油浴(95℃)中で60分間、還流しながら加熱した。混合物を、室温まで冷却し(0.5時間)、そして減圧下で濃縮し、粘性残留物を生成した。この物質を、水100mLに溶解し、次いで、水を減圧下で蒸発させ黄色の油を生成した。このオイルを、最小量のメタノール中の水の溶液(20% V/V)に溶解し、そして少量の析出物が観察されるまでアセトニトリルで処理した。析出物を濾過(0.45μmメンブランフィルター)で除去し、そして濾液を減圧下で濃縮した。この工程を、各回ごとに析出物を捨てながら、さらに2回繰り返した。最後に、

Co., Milwaukee, WI)を、無水ジメチルホルムアミド(DMF; Aldrich)25mLに懸濁し、そして、ドバミン(3.78g; 2.00mmol; Fluka-USA, Ronkonkoma, NY)およびジイソプロピルエチルアミン(5.2g; 4.0mmol; Aldrich Chemical Co.)で処理した。次いで、この混合物を短時間で100℃まで加熱し、数分間超音波処理し、固体の大部分を溶解した。50~60℃で1~5時間攪拌した後、濃黄色の溶液が生成した。次いで、反応混合物を室温まで冷却した。

周囲温度で一晩攪拌した後、反応混合物を、50℃でロータリーエバポレーターを用いて約10mLの体積まで濃縮した。ジイソプロピルエチルアミンは、この時点で無かった。水(25mL)を加え、そして生成した溶液をエチルエステルの20mL量で2回洗浄し、残ったDMFを除去した。次いで、水を減圧下で除去し、ベージュ色のペーストを生成した。この物質を、無水エタノール(10~20mL中に懸濁し、そして、減圧下で水性エタノールの共沸蒸留により乾燥した。前生成物(7g; 理論値の47%)は、砂状で、オフホワイトの、吸湿性の固体だった。

分析上純粋なサンプル(1.78g; 理論値の28%)を、4.8 × 1.50mmのマイクロソープ(Microsorb)C-18逆相カラム(Rainin Instrument Co., Emeryville CA)を使用して、分離用高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)により分離した。移動相(流速1mL/分)は、12分間、5~50%のアセトニトリル水溶液の線型勾配とした。移動相の両成分中に存在する0.1%トリフルオロ酢酸により、pHを酸性に保持した。276nmの吸収を測定するUV検

出器を使用した。これらの条件下で、生成物の保持時間は13.5分だった。¹H NMRスペクトル: δ 6.73, m, 6H; δ 3.81~2.62, 26 H, 脂肪族H, これ以上は帰属されなかった。

液体二次イオン質量スペクトル(LSIMS)[M-H]⁺ = 662(理論値662)。

実施例 1.5

DTPA-ビス(3,4-ジメチルキシフェネチルアミド)

([DTPA-(3,4-DMPPE)₂])の調製

等モル量のDTPA-ビス(無水物)および3,4-ジメチルキシフェネチルアミン(Aldrich Chemical Co.)を上記実施例 1.5と同様にして接触させ、収率約100%で粗生成物を得た。この物質を、分離用HPLCで精製し、タイトルの化合物1.23g(17%)を生成した。

¹H NMRスペクトル: δ 6.50, m, 6H; δ 3.62, s, 6H, CH₃O-; δ 3.80, s, 6H; CH₃O-; δ 3.45~2.76, 26 H, 脂肪族H, これ以上は帰属されなかった。

LSIMS質量スペクトル: [M-H]⁺ = 718(理論値718)。

実施例 1.7

Gd-DTPA-(3-NTA)₂の調製

画像法実験用のGd-DTPA-(3-NTA)₂の溶液を、水溶液中のDTPA-(3-NTA)₂と、水に溶解された化学量論的量のGdCl₃とを反応させることで調製した。約90%のGdCl₃を添加した後、反応混合物のpHを、NaOH水溶液で3~5の間に調整した。次いで、キシレノールオレンジ指示薬(1mg/mLの水溶液1滴)を添加し、

そして指示薬が黄色から紫色に変わるまで(pH6)、GdCl₃溶液を滴下した。次いで、NaOH水溶液、および必要であればHCl水溶液で、pHを7~8の間に調整した。反応混合物を、0.22μmの減菌フィルターを通して滅菌血清バイアル中に入れた。0.02から0.5Mの範囲である最終濃度は、反応物の最初の濃度、およびpH調節のために添加された塩基および酸の容量に依存する。

生成物の質量分光分析用のサンプルを、HPLC(4.6 × 150 PRP-1カラム; 流速1mL/分; 15分間で3~45%のアセトニトリル水溶液勾配)により得た。LSIMS[M-H]⁺の銀イオンピークが、815~824で観察され、819に最高強度を有していた。ピーク強度の割合は、理論C₂₆H₃₀GdH₅O₁₂により予測されたものだった。

実施例 1.8

Gd-DTPA-(3,4-DMPPE)₂の調製

このキレートは、上記実施例 1.7のGd-DTPA-(3-NTA)₂と同様にして、DTPA-(3,4-DMPPE)₂およびGdCl₃から調製された。

実施例 1.9

Gd-DTPA-(3-NTA)₂およびGd-DTPA-(3,4-DMPPE)₂を使用する

インビボ磁気共鳴画像法

直径5cmの分布容量イメージングコイル(distributed-capacitance imaging coil)を備えたCSI 2テスライメージャー(GE, Inc., Freeport, CA)を使用して、磁気共鳴画像法を行なった。T1強調(TR 300/TE 5;HEX 4)スピンエコー系列を使用した。イメージマトリクスは128 × 128、スライス厚は3mm、そして

照射領域(field-of view)は90mmだった。前方(心臓位置)および後方(腎臓位置)の前後面画像を使用した。

スプレーグドローラット(250~350g; 各造影剤に対しn = 4)を、塩酸ケタミン(90mg/kg)およびジアゼパム(10mg/kg)で麻酔し、外側尾静脈中に、静脈カテーテルを取り付けた。腹腔カテーテルを通して供給されたペントバルビタールを用いて画像化中麻酔を維持した。

麻酔された動物をイメージングコイル中に置き、テーブルで固定した。次いで、動物を入れたコイルを、マグネットボア(magnet bore)中に置き、磁場を極調整した。注入前コントラスト画像を得た。次いで、造影剤(100μmol/kg)を、外側尾静脈カテーテルを通して注入し、注入後30分まで隔々の間隔で更に画像を得た。

操作者に指定された対象領域(ROI)内の平均レグナル強度(SI)を測定して造影剤増強を決定した。これらを、次の式に従い、各ROIについて、注入前の値に対し正規化した:

$$\%増強 = 100 \times (S_{post} - S_{pre})/S_{pre}$$

各造影剤について、心臓、肺、腎臓、肝臓、および骨格筋のコントラスト増強(平均 ± 標準偏差, n = 4)を、時間の間数として、それぞれ図9~13に示す。Gd-DTPA-(3-NTA)₂は、より高い肺の増強(185 ± 51%対141 ± 4%)を生じる傾向もある。しかしながら、2つの薬剤により生じる効果の相違は、心臓におけるよりも小さかった(図9および10を比較せよ)。

腎臓の増強では、有意差はなかった(図11)。両薬剤は、

注入後5分で約175%の増強を生じた。増強のレベルは、70分の間に徐々に約100%まで落ちた。

両薬剤共に、注入直後に約50%の増強を、肝臓中に生じた(図12)。さらに、注入後、両薬剤とも最初の20分間で増強のレベルが約30%落ち、増強の時間経過は非常に類似していた。

骨格筋は、注入直後に約40%の増強のピークを示した。両薬剤の増強-時間曲線は、ほとんど同一であった; それらはそれぞれ80分で、ほぼ注入前のレベルに落ちた(図13)。

各薬剤を使用した典型的な画像を、MRI写真画像として、図14 Aおよび14 Bおよび15 Aおよび15 Bに示す。

実施例 2.0

Gd-DTPA-(L-PheOEt)₂およびGd-DTPA-(D-PheOEt)₂を使用する

インビボ磁気共鳴画像法

2種の造影剤Gd-DTPA-(L-PheOEt)₂およびGd-DTPA-(D-PheOEt)₂の磁気共鳴画像法の特徴を、それぞれ4匹および5匹の動物群を用いて、前記実施例と同様にして比較した。図15~20に、それぞれ心臓、肺、腎臓、肝臓および骨格筋における各薬剤のコントラスト増強対時間の変動を図示する。

各薬剤を使用した典型的な画像を、MRI写真画像として、図21 Aおよび21 Bおよび22 Aおよび22 Bに示す。

実施例 2.1

pH7.4緩衝液およびラット血漿中での

Gd-DTPA-(L-PheOEt)₂およびGd-DTPA-(D-PheOEt)₂の加水分解
ラット血漿またはpH7.4 HEPES緩衝液中でのエステル類の加

水分解の速度を、10体積%のGd-153放射性標識化した0.025Mキレート溶液を添加し、そして0または25℃でインキュベートすることにより測定した。種々の時間間隔でアリコートを取り、HPLC[PRP-1カラム; 水-アセトニトリル勾配; 25mM酢酸アンモニウム、pH7の移動相]で測定した。

pH7.4および25℃の水性HEPES緩衝液中での、LL-またはDD-ビス(エステル)鏡像異性体の対応するモノ(エステル)-モノ(酸)へ、そしてそれからビス(酸)への加水分解は非常に遅く、各段階の半減期は日のオーダーである。

しかしながら、ラットの血漿中では、LL-ビス(エステル)は、モノ(酸)-モノ(エステル)へ非常に速く加水分解される(以下を参照)。後者の化合物は、残ったエステルよりも非常に大きな加水分解性を有し、25℃で1時間以内には、反応は本質的に全く観察されなかった。

対照的に、DD-ビス(エステル)は、これらの条件下では、エステルの加水分解の第1段階でさえ低反応性を有する(以下を参照)。

ラット血漿中のエステル加水分解の11.2

	00℃	025℃
Gd-DTPA-(L-PheOEt) ₂	33分	0.3分
Gd-DTPA-(D-PheOEt) ₂	検出されず	検出されず

血漿に比べ水溶液での加水分解に対するビス(エステル)の

相対的安定性は、血漿反応が酵素触媒されていることを示唆する。さらに、その加水分解の速度が非常に遅いので、明らかにモノ(酸)-モノ(エステル)は、非常に劣悪な基質である。これは、キレートの実効電荷の変化(0から-1へ)、および/または遊離フェニルアラニンカルボキシレート基によるGdの配位に基づく分子のコンフォメーションの変化のためであり得る。

キレートのアミノ酸部分の立体化学を非天然のD-鏡像異性体へ変化させることにより、血漿でのエステルの加水分解の速度は大きな減少を引き起こす。

実施例2.2

尿および胆汁排出の相対量の決定

雄のスプレーグ-ドーリーラットに、塩酸ケタミン(90mg/kg)およびジアゼパム(2mg/kg)の混合物を腹腔内に注射して麻酔し、外側尾静脈に、23ゲージのカニューレを取り付けた。次いで、正中切開し、そして腹腔の上を小さく横に切り、尿管を露出した。尿管を近位の2箇所ですく結紮した。遠位に小さな切れ込みを作り、2箇所を隔って固定された15cmの長さのPE-10ポリエチレン管で、尿管にカニューレ挿入(cannulate)した。

2つめの管を膀胱に差し、巾着結合で固定した。尿管の組織弁を閉じ、切開部をガーゼで覆った。

ヘパリンを加えた(1単位/mL)食塩水を、静脈カテーテルを通して0.075mL/分の速度で注入した。15分の安定期間の後、

Gd-153標識化造影剤の瞬時投与(0.1mCi/kg)をするのに十分な長い間、注入を中断し、そしてその後再開した。胆汁および尿のサンプルを、放射性標識された造影剤の注入の前および後に、規則正しい間隔で、風袋を覆った試験管に採取した。これらのサンプルの正確の重量を測定した。各サンプル中に存在するGd-153の量を、箱型ガンマ線計数器(chamber gamma counter)で測定した。未修正の計数を、バックグラウンドに対して補正し、そして注入されたGd-153の全量に対して正規化した。

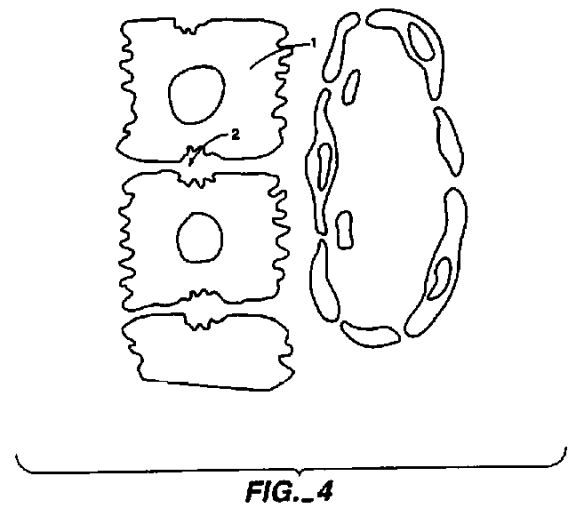
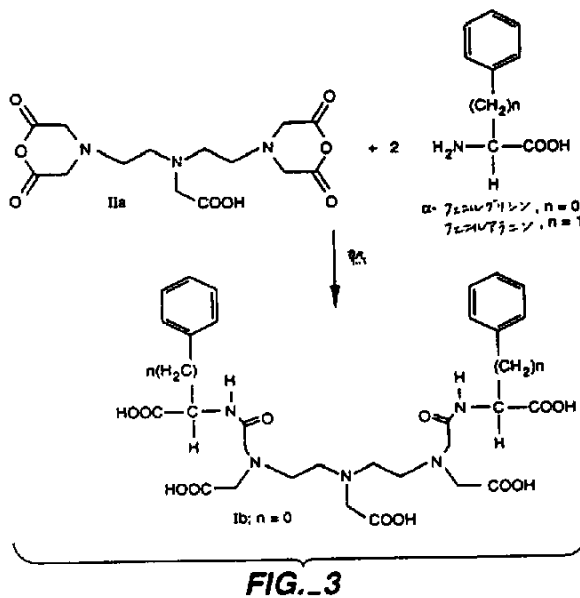
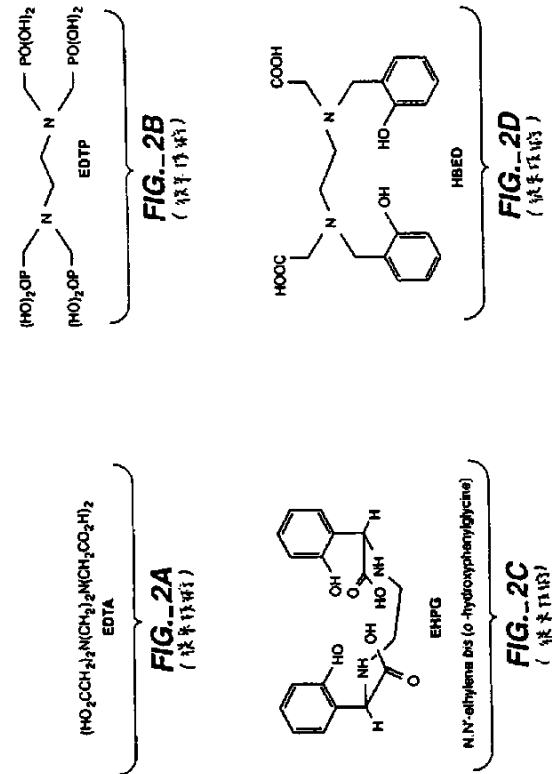
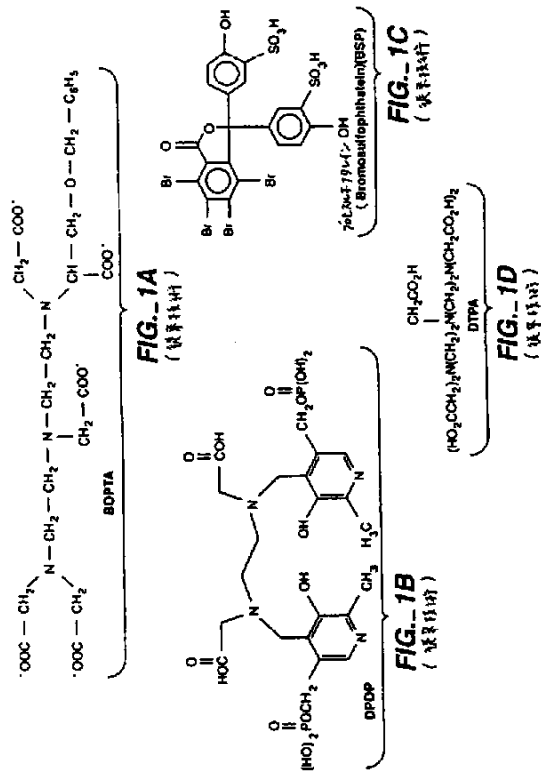
以下の表は、前記の実施例中に記載された造影剤のいくつかについて得られた結果(1時間の累積排出; 3匹の動物の平均)を要約する:

1時間の累積排出

	胆汁	尿
Gd-DTPA-(L-Phe) ₂	9.3±1.3	66.5±8.7
Gd-DTPA-(L-PheOEt) ₂	30.5±7.4	45.9±8.8
Gd-DTPA-(D-PheOEt) ₂	51.3±5.1	39.2±5.5
Gd-DTPA-(L-PheHCH3) ₂	2.5±0.4	70.9±6.5

本発明の少数の実施態様のみを、本明細書中に示し、そして記載したが、アミノ酸を含有する肝胆管または心臓造影剤、あるいは哺乳類の胃または腸部の造影剤画像法でのそれらの使用において、種々の部分的変更および改良が、本発明の精神および範囲から外れずになされ得ることが、当業者に明

らかになる。リガンドLのRまたはR'系は、芳香族またはヘテロ芳香族部分を任意に包含する。添付の請求項の範囲内での、すべてのこのような部分的変更および改良は、本発明により実施されることを意味する。



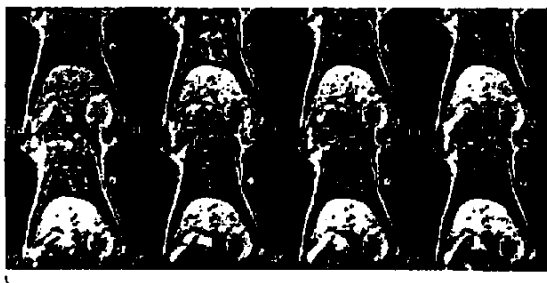


FIG. 5A



FIG. 6A



FIG. 5B



FIG. 6B

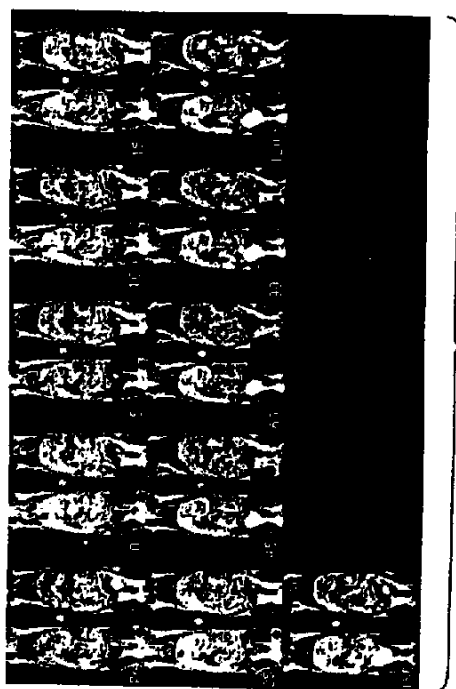


FIG. 7

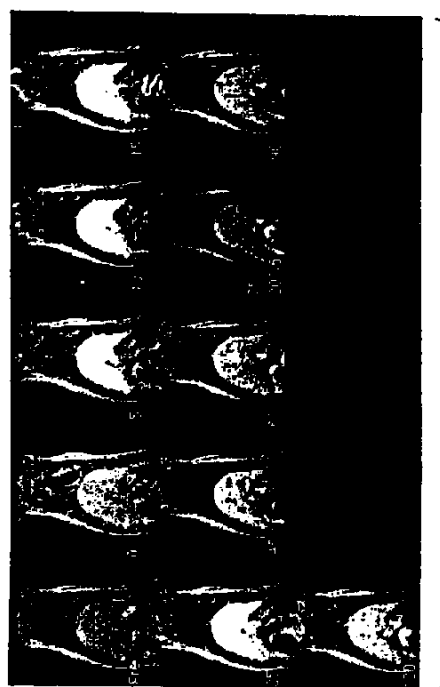
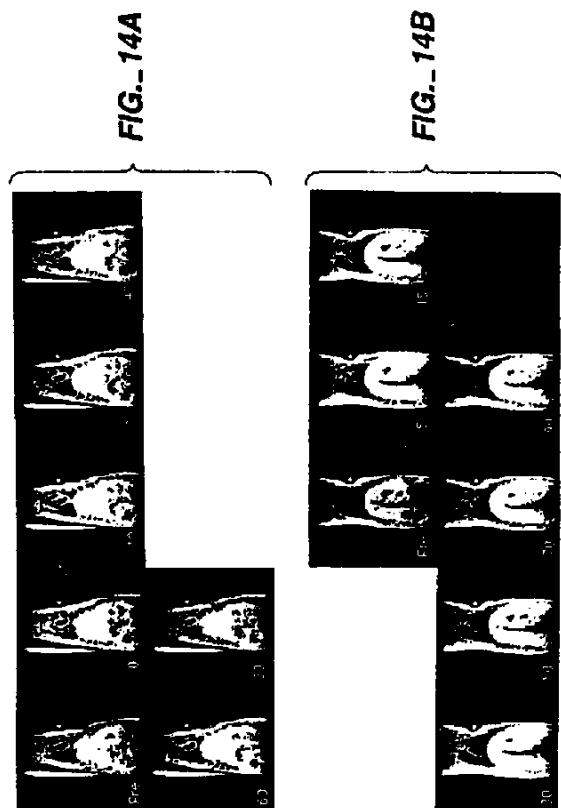
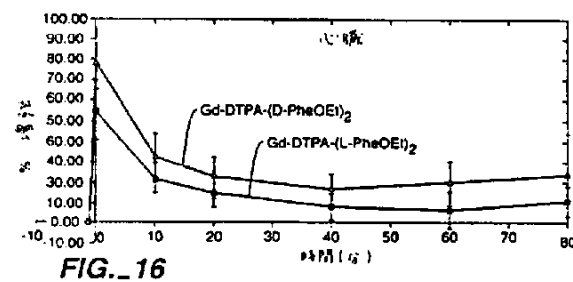
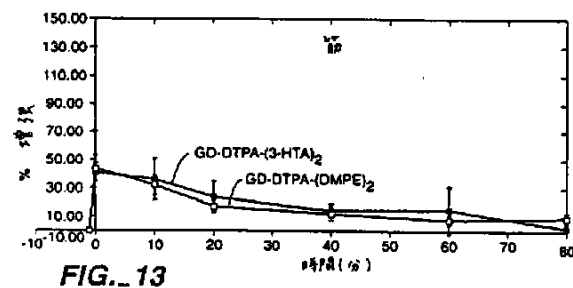
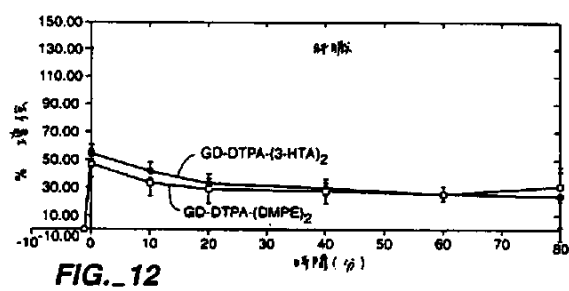
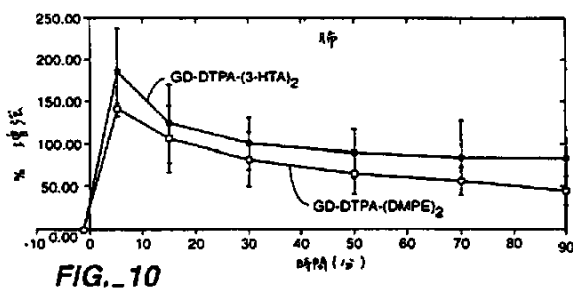
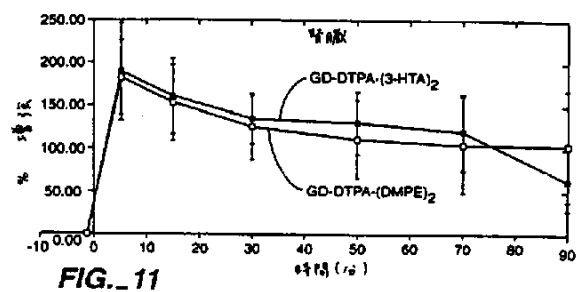
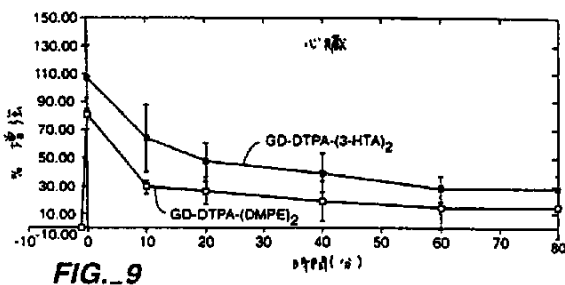


FIG. 8



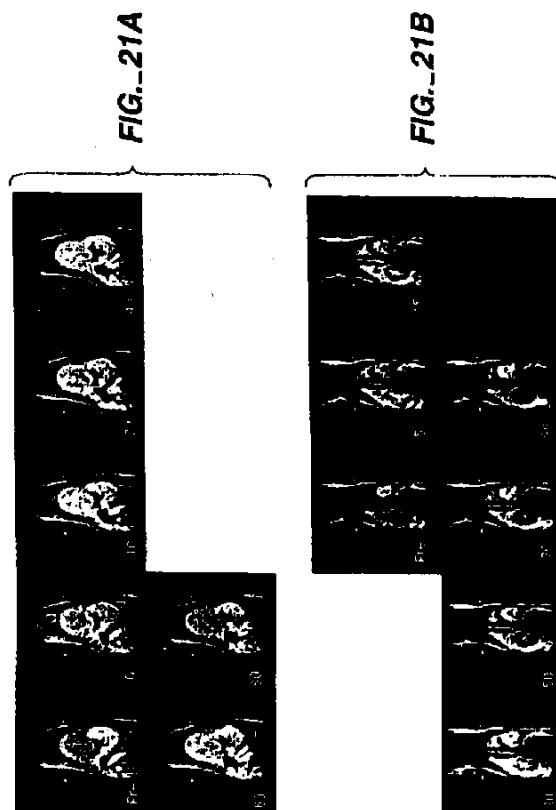
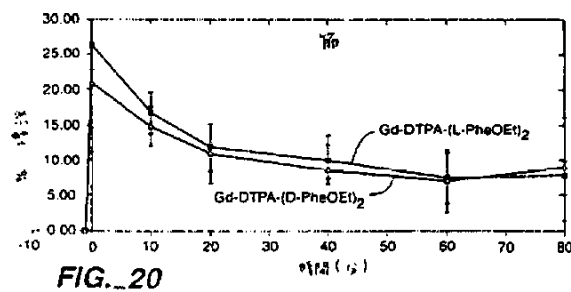
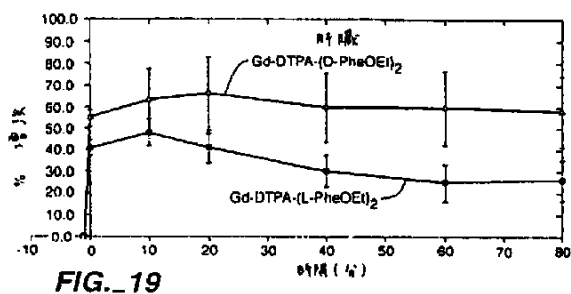
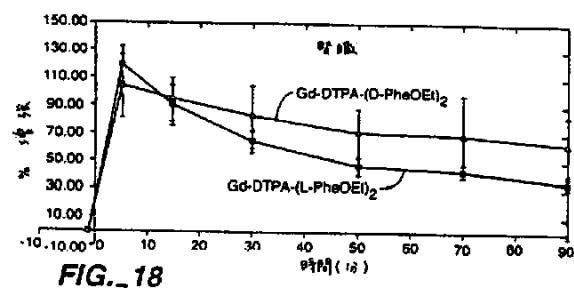
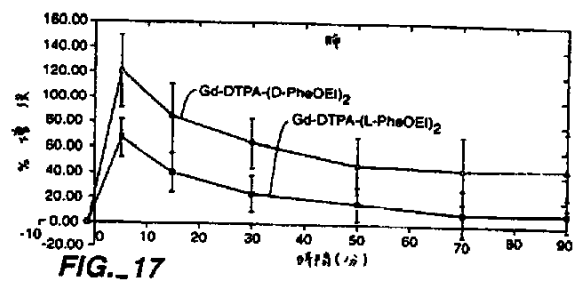
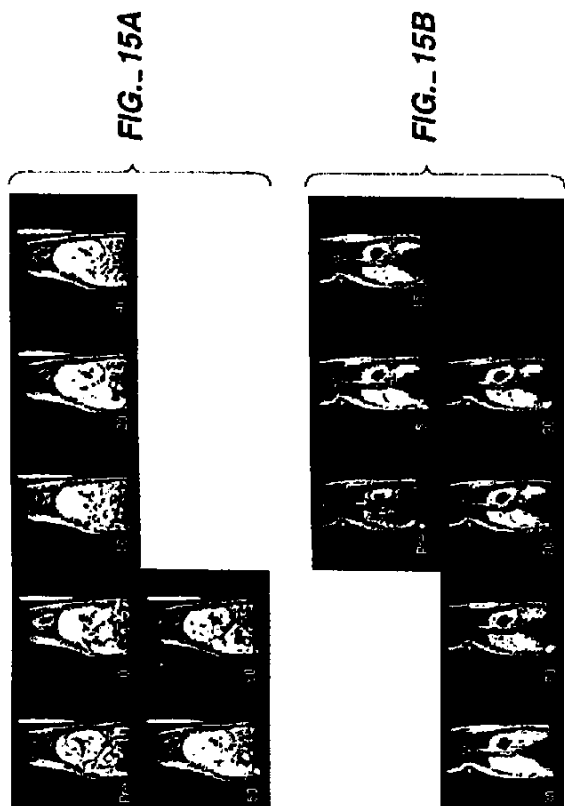
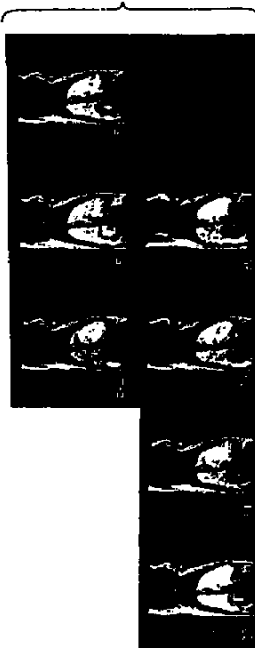


FIG.-22A



FIG. 22B



告 報 差 異 原 因

International application No.
PCT/JP2002/00002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(s): G01M 34/00; C07F 10/00
US CL. 426/9; 362/563; 436/177,808; 428/633; 4,604; 334/16; 364/223; 364/2

3. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation attached (classification system followed by classification symbols)

4.9.

Documents searched other than newspaper clippings in the extent that such documents are included in the fields searched.

Electronic data base operated during the international search week of data base and, where practicable, search terms used

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim 10
Y	US, A. 4,352,751 (WIEDER ET AL.) 01 October 1982, See abstract and col. 8, line 48 - col. 9, line 48.	1-21
Y	US, A. 2,394,230 (BILLMAN) 05 February 1946, See formula 14.	1-21
Y	WO, A1, 89/0979 (KLAIVENESS ET AL.) 10 August 1989, See claim 1 and example 1.	1-21
Y	WO, A1, 91/05762 (LOVE, ET AL.) 02 May 1991, See claim 1.	1-21
Y	FR, A. 2,045,987 (STAUFFER CHEMICAL COMPANY) 05 March 1971, See pages 4-8.	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C

☐ 3-oz. portion Gummy cereal

1	Technical assistance to other domestic	was deemed prohibited under the agreement. Thus, no payments
2	agreements defining the amount of the fee or whether it was considered	to be a contract with the respondents but not as a prohibited
3	in part of particular domestic	agreement or arrangement for the services
4	whether domestic prohibition or no after the agreement (this	agreement of respondents) the charged programs were not
5	agreements that have been made to provide (which in which is	considered) that no amounts to be charged to respondents
6	to the respondents on the basis of the amount of other	agreements in which is being made
7	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
8	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
9	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
10	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
11	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
12	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
13	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
14	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
15	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
16	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
17	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
18	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
19	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
20	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
21	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
22	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
23	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
24	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
25	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
26	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
27	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
28	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
29	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
30	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
31	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
32	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
33	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
34	agreements (which is the amount of the amount of other	agreements of parties to the agreement which the character
35		

Date of the instant completion of the institutional work:

Date of reading of the international search report

21 OCTOBER 1992

10 DEC 1992

Name and address of the LEAD to:

Authorized officer *John A. Thompson*

Department of Foreign and Trade Affairs
Box 100

GARY E. MOLLERUDEN

Washington, D. C. 20535
 Filing No. NOT APPLICABLE
 Form FST-21A/21B (Issued January 1979)

Telephone No. (703) 298-1215

國際調查報告

Ref. number application No
PC-14-1070-0000

BOX B. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF DIVISION WAS LACKING
The USA found unity lacking in the following:

Each of Usury is opposed to the chief intention as identified herein.

- I** The smallest group of formulae is where n is at least one R is a heterocyclic group (amine, acid, a pyrazole, a pyridine and naphthalene) and a method of using and comparing for synthesis resources pages.

Claims 1-74 are generic to both of the grouped inventions.

Clarity, a reference which would anticipate Group I would not necessarily anticipate or even might obscure the arrangement of Group II. Further, the structure of the arrangement set out is self-evident, particularly with regard to the separate search required and would certainly not impose burden for the EASB/ERS. Since the compounds are grouped represent independent classes of compounds, each is capable of representing its own patent.

However, these techniques do not provide a single general investment strategy for the various group above. Restrictions for determining investment are indicated in Figure 1.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. *	識別記号	序内整理番号	F I
C 0 7 F 11/00		A 9155-4H	
13/00		A 9155-4H	
G 0 1 R 33/28			

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, SE), CA, JP

(72) 発明者 イーソン, ロバート ジー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94617,
サンフランシスコ, ペイジ ストリート
1256